

## 大腸癌における matrix metalloproteinase pump-1 の 発現及びその活性化癌遺伝子との関連性

吉 本 満

札幌医科大学内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

### Expression of Matrix Metalloproteinase Pump-1 in Colorectal Cancer and Its Relation to Activated Oncogene

Mitsuru YOSHIMOTO

Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. A. YACHI)

**ABSTRACT** Matrix metalloproteinases, which consist of type IV collagenase, stromelysin, interstitial collagenase and pump-1, have been suggested to play a critical role in tumor invasion and metastasis.

To study the relation between protease and tumor invasion, it is important to detect the expression of these enzymes *in vivo*. For this purpose, we have utilized a RT-PCR technique to detect the expression of pump-1 mRNA in colorectal cancer.

Total RNAs from surgical specimens of colorectal cancer were analyzed. In 6 out of 10 colorectal cancer tissues, the PCR product from pump-1 mRNA was clearly detected in an electrophoresed agarose gel stained with ethidium bromide. In the other 4 cases, trace amounts of pump-1 mRNA were detected. However, in adjacent normal tissues it was hardly detected. Colorectal cancer cell lines were also examined. Pump-1 mRNA was expressed in BM314, but not in Colo201, Colo320, DLD-1, CHC-Y1 nor SW948.

Transcriptional regulation of other matrix metalloproteinases have been shown to be affected by oncogene activation. Because of this, we transfected pRSVras12, which was designed to express activated Ki-ras gene, into HeLa cells and then examined expression levels of pump-1 mRNA by RT-PCR. The result showed that pump-1 mRNA was detected in Ki-ras-expressed HeLa cells. However, cells transfected with a control plasmid did not show a detectable amount of pump-1 mRNA.

These results suggested that pump-1 mRNA is expressed in colorectal cancer in a tumor-associated manner, and that pump-1 gene expression could be mediated by signals induced with an activated oncogene.

(Received January 6, 1992 and accepted January 31, 1992)

**Key Words:** Metalloproteinase, Pump-1, Ki-ras, Colorectal cancer

#### 1 緒 言

癌が、宿主である生体に及ぼす最も悪性な性質は、隣接する組織に浸潤し、血流やリンパ流を介して他部位に転移する性質である。

癌細胞が正常組織の中を浸潤していく現象には、酵素反応による細胞外マトリックスの融解が関与してい

ると考えられている。Liotta<sup>1)</sup>はこの過程を癌細胞のマトリックスへの粘着、プロテアーゼの分泌、その結果生じたマトリックスの間隙への癌細胞の移動、の3つに分類した。

細胞外マトリックスを分解するプロテアーゼは、matrix metalloproteinase (MMP)と総称され、遺伝子ファミリーを形成している。この中には、type IV

collagenase<sup>2)3)</sup>, interstitial collagenase<sup>4)</sup>, stromelysin<sup>5)</sup>, pump-1<sup>6)</sup> などが含まれ、癌細胞によるこれらの酵素の産生が浸潤・転移の主要な機序の一つであると報告されている<sup>7)</sup>。

大腸癌の浸潤過程における matrix metalloproteinase の関与についても最近報告が見られる。Morikawa *et al*<sup>8)</sup> は、大腸癌由来細胞株を用いて type IV collagenase 活性とヌードマウスにおける転移巣の形成が相関することを示した。マウスの大腸癌由来細胞株においても上清から type IV collagenase が検出されている<sup>9)</sup>。また Miyazaki *et al*<sup>10)</sup> は、ヒトの大腸癌のリンパ節転移巣から確立した細胞株が pump-1 を分泌していることを示した。このように、大腸癌についても癌の浸潤・転移に MMP が関与することが明らかにされつつある。

本研究では、大腸癌の切除材料を用いて、reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により pump-1 遺伝子の発現を検索し、*in vivo* における matrix metalloproteinase の関与について検討した。さらに、活性化 *ras* 遺伝子を培養細胞に導入して、癌遺伝子の活性化と pump-1 発現の関連についても検討した。

## 2 方 法

### 2.1 培養細胞株及び手術摘出組織

#### 2.1.1 培養細胞株

大腸癌由来細胞株として、BM314, CHC-Y1, Colo201, Colo320, DLD-1 及び SW948 を、10%牛胎仔血清加 Dulbecco 変法 Eagle 培養液 (Flow Laboratories Inc., VA) を用い、37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。

ター内で培養した。

またヒト子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞を、2%牛胎仔血清加 Dulbecco 変法 Eagle 培養液、あるいは 0.1% lactoalbumin hydrolysate 加 Dulbecco 変法 Eagle 培養液で培養し、活性化 *ras* 遺伝子の細胞内導入に用いた。

#### 2.1.2 手術摘出組織

10 例の大腸癌患者の手術摘出組織より、癌組織及び非癌部組織を採取し、速やかに凍結して保存した後、total RNA の抽出に用いた。いずれの症例も手術以前に化学療法、放射線療法などの癌に対する治療を受けていなかった。Table 1 にこれらの症例の年齢、性別、腫瘍の部位、病理組織学的診断、腫瘍の深達度、リンパ節転移の有無、肝転移の有無を示す。なおこれらの症例については informed consent が得られている。

### 2.2 RT-PCR 法

#### 2.2.1 Total RNA の抽出

2.1.1 で得た培養細胞から Chomczynski *et al*<sup>11)</sup> の方法で total RNA を抽出した。また手術摘出組織については、guanidinium thiocyanate 法<sup>12)</sup> によって total RNA を抽出した。

#### 2.2.2 primer の作製

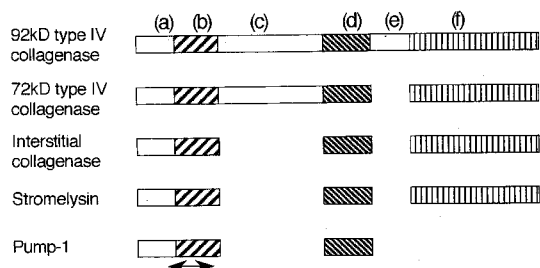
Fig. 1 に、pump-1 を含む matrix metalloproteinase 遺伝子ファミリーのドメイン構造を示す。Muller *et al*<sup>6)</sup> によって決定された cDNA 配列に基づき pump-1 の primer を作成した。5'AGATGTG-GAGTGCCAGATGT3' (コドン 86 から 91 に相当) の合成オリゴヌクレオチドを sense primer とし、5'TAGACTGCTACCATCCGTCC3' (コドン 198 から 203 に相当) を antisense primer とした (Fig. 1)。

Table 1 Clinical characteristics of analyzed 10 patients with colorectal cancer used in this study

Case No.	Sex /Age	Location	Histology	Depth of invasion	Lymphnode metastasis	Liver metastasis
1	M/71	ascending	well diff. <sup>a</sup>	ss	—	—
2	M/72	rectum	mod. diff. <sup>b</sup>	pm	+	—
3	M/66	sigmoid	well diff.	pm	—	—
4	F/51	sigmoid	well diff.	ss	—	—
5	F/54	rectum	mod. diff.	pm	—	—
6	F/44	sigmoid	well diff.	ss	—	—
7	M/55	rectum	mod. diff.	ss	—	—
8	M/65	sigmoid	mod. diff.	sm	+	+
9	F/46	sigmoid	mod. diff.	ss	+	—
10	F/64	rectum	mod. diff.	pm	—	—

a : well differentiated adenocarcinoma

b : moderately differentiated adenocarcinoma



**Fig. 1** Domain structures of human matrix metalloproteinase family members. Referring to the 92-kDa type IV collagenase, from left to right, a N-terminal propeptide domain(a), a N-terminal domain of active enzyme(b), a fibronectin-like collagen binding domain(c), a catalytic domain(d), an  $\alpha 2(V)$ -like domain (e) and a hemopexin-like carboxy terminal domain(f) (modified from ref. 3). Arrow under the pump-1 protein structure indicates the site of fragment which was amplified by PCR.

c-Ki-ras の primer は Haliassos *et al*<sup>13)</sup> に従って、5'TAAACTTGTGGTAGTTGGAGCC3' の 22 mer を sense primer とし、5'TCTATTGTTGGATCATATT3' の 20 mer を、antisense primer として、コドン 12 を含む 99 bp の領域を増幅するようにした。

$\beta$ -actin の primer は<sup>14)</sup> 5'CTGTCTGGCGGCAC-CACCAT3' (コドン 298 から 303 に相当) を sense primer、5'GCAACTAAGTCATAGTCCGC3' (3' 側非翻訳領域) を antisense primer として、両 primer 間に第 5 インtron を介在するようにした。

### 2.2.3 RT-PCR 法<sup>15)</sup>

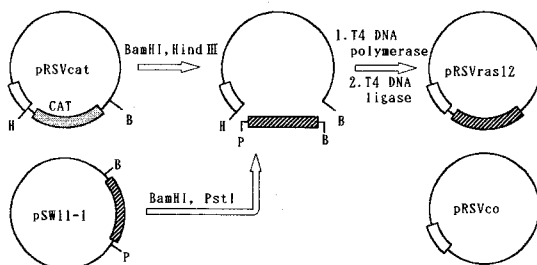
2.1.1 で得た total RNA 1  $\mu$ g を鋳型とし、M-MLV reverse transcriptase (Perkin Elmer Cetus, CT) を用いて 42°C で 15 分間反応させ、cDNA を合成した。次に 2.2.2 で作製した primer と Taq DNA polymerase (Perkin Elmer Cetus, CT) を加え、DNA thermal cycler (Perkin Elmer Cetus, CT) を使用して PCR を行った。PCR の条件は、pump-1 については 94°C 1 分、50°C 2 分、72°C 1 分、のサイクルを 50 サイクル行った。ras については、94°C 1 分 18 秒、50°C 4 分、74°C 1 分 42 秒のサイクルを、50 サイクル行った。 $\beta$ -actin は、95°C 1 分、60°C 1 分を 30 サイクル行った。

増幅終了後、反応液の一部をとり、3% アガロース上で電気泳動を行って、臭化エチジウムで染色した。

## 2.3 活性化 ras 遺伝子のトランスフェクション

### 2.3.1 プラスミド作製

12 番目のアミノ酸に変異(Gly  $\rightarrow$  Val)を持った RAS 蛋白をコードする活性化 Ki-ras 遺伝子 SW11-1<sup>16)</sup> を発



**Fig. 2** Construction of pRSVras12 and pRSVco. pRSVras12 was designed to express SW11-1 cDNA(c-Ki-ras cDNA with point mutation of codon 12) using Rous sarcoma virus LTR as a promoter. In pRSVco, cDNA was not inserted into downstream of the promoter.

現するプラスミドを以下の方法で構築した。

プラスミドベクター pUC13 に SW11-1 を組み込んだ pSW11-1<sup>16)</sup> (JRCB 遺伝子バンクより供与) を制限酵素 Pst I, Bam HI で消化して、SW11-1 cDNA を分離・精製した。次に pRSVcat<sup>17)</sup> を制限酵素 Hind III, Bam HI で消化して chloramphenicol acetyl transferase (CAT) 遺伝子を欠失させた後、ここに SW11-1 cDNA を挿入して pRSVras12 を作製した (Fig. 2)。またコントロールとして遺伝子を挿入していない pRSVco ("control" より命名) を同時に作製し、以下の実験に供した。

### 2.3.2 活性化 ras 遺伝子の HeLa 細胞への導入

HeLa 細胞を 2% 牛胎仔血清加 Dulbecco 変法 Eagle 培養液で培養した。トランスフェクション前日に  $5 \times 10^5$  / 90 mm プレートに細胞密度を調整した。

トランスフェクションは磷酸カルシウム沈澱法変法<sup>18)</sup> による。2.2.2 で作製した pRSVras12 20  $\mu$ g を脱イオン水を加え 450  $\mu$ l とし、続いて、2.5 M  $\text{CaCl}_2$  50  $\mu$ l, 50 mM BES (N, N-bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid)  $\cdot$  280 mM NaCl  $\cdot$  1.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (BES 緩衝液) を 500  $\mu$ l 加え、攪拌した後 10 分から 15 分室温に放置した。この溶液を細胞に加えて、37°C, 3%  $\text{CO}_2$  にて培養した。12 時間後、細胞を PBS で洗浄して新鮮な培養液に換え、37°C, 5%  $\text{CO}_2$  の条件でさらに 36 時間培養し、total RNA を抽出した。

## 2.4 CAT assay

### 2.4.1 CAT プラスミド

Fig. 3 に示すように、CAT プラスミドとして、CAT 遺伝子の upstream に SV40 初期プロモーター、及びエンハンサーとして AP-1 認識配列<sup>19)20)</sup> を 3 個持つ pX3cat<sup>20)</sup> を用いた。またコントロールとして SV40 初期プロモーター

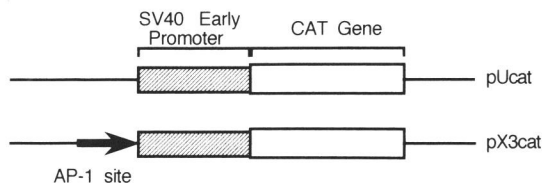


Fig. 3 Structure of 5' flanking region of CAT gene in pUcat and pX3cat. Arrow indicates three copies of a 17 bp synthetic AP-1 site(modified from ref. 25).

を持つがエンハンサーを持たない pUcat<sup>20)21)</sup>(カリフォルニア州立大学 Robert Tjian 博士より供与)を用いた。

2・3・1 で作製した pRSVras12 10  $\mu$ g と CAT プラスミド 10  $\mu$ g を混合し、2・3・2 に示した方法でトランスフェクションした。

#### 2・4・2 CAT 活性の測定

Gorman *et al*<sup>22)</sup> の方法に準じて行った。DNA を加えてから 48 時間後に細胞を集めて、0.18 M Tris・HCl (pH 7.8) に懸濁し、凍結融解を繰り返して蛋白を抽出した。抽出液に Acetyl CoA, [<sup>14</sup>C]chloramphenicol (Amersham, IL) をそれぞれ加え、37°C, 1 時間反応させた。

反応終了後、酢酸エチルで反応液を抽出して乾燥させ、20  $\mu$ l の酢酸エチルに再溶解して、シリカゲル薄層クロマトグラフィー用プレート (Merck, Germany) に spot して 1 時間展開した後オートラジオグラフィー

を行った。

### 3 成 績

#### 3・1 pump-1 遺伝子転写産物の RT-PCR 法による検出

大腸癌に由来する細胞株, BM 314, CHC-Y 1, Colo 201, Colo 320, DLD-1, 及び SW 948 から抽出した total RNA を用いて RT-PCR を行い、増幅した DNA を臭化エチジウムで染色したものを Fig. 4 (a) に示す。cDNA 配列から予測される 365 bp と同サイズのバンドが, BM 314 において認められ、他の種類の細胞株には見られなかった。

このバンドが pump-1 mRNA の増幅産物であることを確認するため、制限酵素 Alu I, Cla I, 及び Taq I による切断を行なった。その結果, Fig. 4(b) に示すように、cDNA 配列から予測された通りのサイズのバンドが得られた。

さらに、PCR 産物をベクター pBluescriptII (Stratagene, CA) に組み込み、dideoxy 法<sup>23)</sup>によって塩基配列を決定した。その結果、BM 314 の total RNA より増幅されたバンドが pump-1 mRNA 由来であることが確認された。

#### 3・2 大腸癌組織における pump-1 遺伝子の発現

外科的に切除された 10 例の大腸癌及び隣接非癌部組織における pump-1 mRNA の発現を RT-PCR 法で検索した。

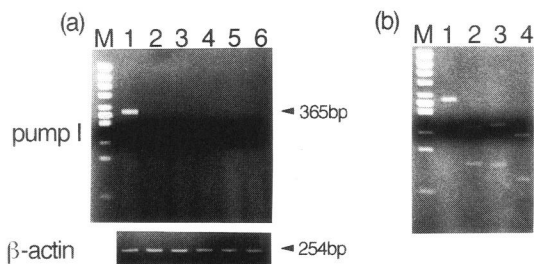


Fig. 4 (a) Detection of pump-1 mRNA by RT-PCR in colorectal cancer cell lines. M,  $\phi$ X174/HincII digest; lane 1, BM314; lane 2, CHC-Y1; lane 3, Colo320; lane 4, Colo201; lane 5, DLD-1; lane 6, SW948

(b) Analysis of PCR product by cleavaging with restriction enzymes. As indicated by the pump-1 cDNA sequence, digestion with Alu I, Cla I and Taq I produced 127 bp and 229 bp, 233 bp and 123 bp, and 197 bp and 96 bp fragments, respectively.

M,  $\phi$ X174/HincII digest; 1, PCR product; 2, 3, 4, PCR product digested with Alu I, Cla I and Taq I, respectively.

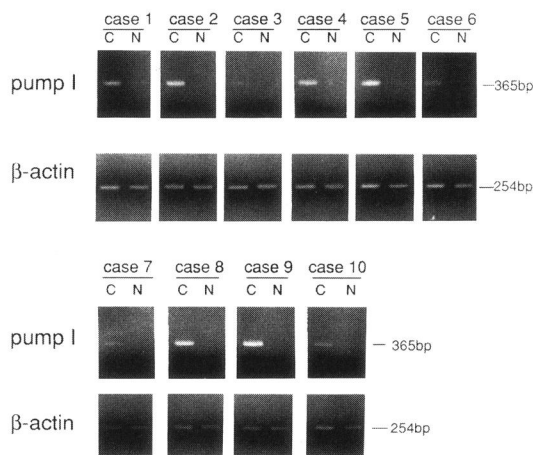


Fig. 5 Expression of pump-1 mRNA in human colorectal cancer tissues. Total RNAs from fresh surgical specimens were analyzed by RT-PCR.  $\beta$ -actin mRNA expression detected by RT-PCR were also shown. C, tumor tissue sample; N, adjacent normal tissue sample.

Fig. 5 に示すように 10 例の大腸癌のうち、6 例において pump-1 遺伝子の明らかな発現が見られた。また残り 4 例にも微量の pump-1 mRNA の PCR 産物を認めた。

また、同一症例の非癌部組織では、一部の症例で微量な PCR 産物が見られた以外、この条件下では mRNA の発現を検出できなかった。

$\beta$ -actin の primer を用いて、同様に RT-PCR を行った。それぞれのサンプルにおいて、癌部と非癌部に大きな差は認めず、ほぼ均一な  $\beta$ -actin の転写産物の存在を示していた。以上のことから、pump-1 遺伝子の発現は癌部において、非癌部と比較して明らかに増強していることが強く示唆された。

### 3.3 活性化 *ras* 遺伝子の導入と pump-1 遺伝子の発現

c-Ki-*ras* 遺伝子の、12 番目のコドンが GGT から GTT に変異した遺伝子、SW11-1 を Rous sarcoma virus の LTR に由来するプロモーターの下流に組み込んで HeLa 細胞に導入した。

#### 3.3.1 導入された活性化 *ras* 遺伝子の転写産物の検出

2.2.2 で作製した primer を用いて RT-PCR 法を行った。この primer では、コドン 11 に相当する GCT が GCC になっており、コドン 11 から 12 に相当する塩基 GCTGGT が PCR 産物ででは GCCGGT となり、制限酵素に感受性の部位 (Msp I 部位) が生じる (Fig. 6A)。コドン 12 に点突然変異がある場合は Msp I 部位が出来ないため、PCR 産物を Msp I で消化することにより、コドン 12 の変異の有無が検出可能である。

PCR 産物を電気泳動したところ、未処理の HeLa 細胞、pRSVras12 を導入した細胞、及び pRSVco を導入した細胞において *ras* mRNA の増幅産物である 99 bp のバンドが見られた (Fig. 6B の(a))。

次に PCR 産物をエタノール沈澱して精製した後、制限酵素 Msp I で消化した。Fig. 6B の(b)に示すように、未処理の HeLa 細胞、及び pRSVco を導入した HeLa 細胞では、PCR 産物が Msp I により切断されて、78 bp の位置に泳動された。一方 pRSVras12 を導入した HeLa 細胞 (Fig. 6B のレーン 2) では、PCR 産物は Msp I による消化を受けず、99 bp のバンドが認められた。このことより、PCR 産物は点突然変異を有する *ras* 遺伝子の増幅産物であることを示された。

以上のことから pRSVras12 を導入した細胞において活性化 *ras* 遺伝子が発現していることが強く示唆された。

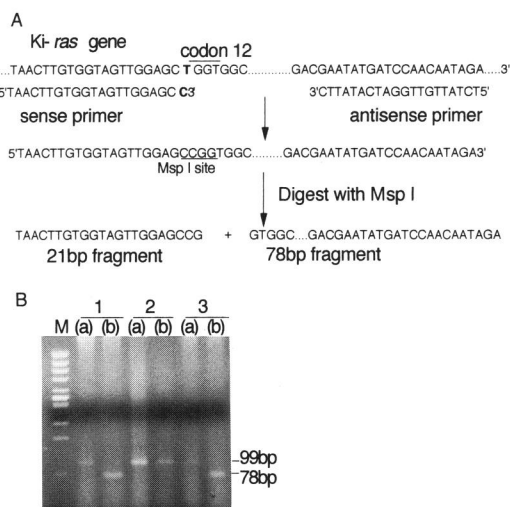


Fig. 6 A. Method for detection of codon 12 mutation of Ki-*ras* gene. If the PCR product does not have a point mutation in codon 12, digestion of the PCR product with Msp I produces 21 bp and 78 bp fragments (see ref. 13). B. Detection of Ki-*ras* mRNA from HeLa cells. Total RNAs were analyzed by RT-PCR. The samples were as follows: M,  $\phi$ X174/HincII digest; lane 1, untreated HeLa cells; lane 2, HeLa cells transfected with pRSVras12; lane 3, HeLa cells transfected with pRSVco. (a), PCR product; (b), PCR product digested with Msp I

#### 3.3.2 活性化 *ras* 遺伝子の導入による pump-1 遺伝子の発現

そこで次に、導入された活性化 *ras* 遺伝子の発現が pump-1 遺伝子の転写に与える影響を検討した。

未処理の HeLa 細胞、pRSVras12 を導入した細胞、pRSVco を導入した細胞からそれぞれ抽出した total RNA を対象に、pump-1 の primer を用いて RT-PCR を行った。

Fig. 7 に、PCR 産物の一部を電気泳動した結果を示す。pRSVras12 を導入した細胞では、pump-1 mRNA の存在を示す 365 bp のバンドが確認された。未処理の HeLa 細胞、pRSVco を導入した HeLa 細胞ではバンドは見られなかった。従って、活性化 *ras* 遺伝子の導入・発現に伴って pump-1 遺伝子の転写が誘導されている可能性が示唆された。

#### 3.3.3 活性化 *ras* 遺伝子の導入による AP-1 結合配列の活性化の検討

pX3cat は CAT 遺伝子の 5' 上流にエンハンサーとして AP-1 認識配列<sup>20)</sup> を 3 個持っているため、導入された細胞内で AP-1 (*FOS/JUN*) の活性化が起こると CAT 遺

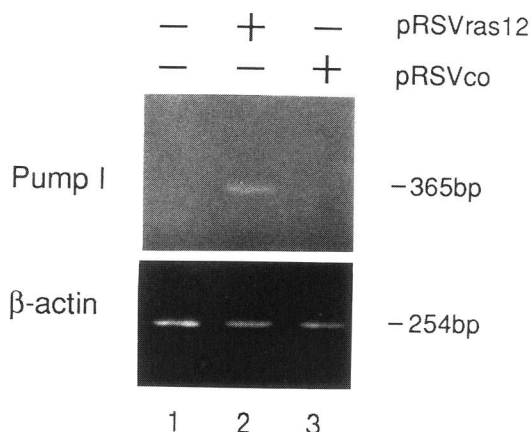


Fig. 7 Effect of Ki-ras activation on transcription of pump-1 gene. Total RNA was amplified by RT-PCR. The samples were as follows: lane 1, untreated HeLa cells; lane 2, HeLa cells transfected with pRSVras12; lane 3, HeLa cells transfected with pRSVco.

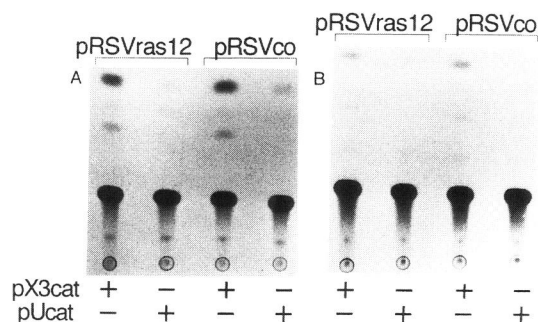


Fig. 8 A. CAT activity of extract from HeLa cells which were transfected with various plasmids. HeLa cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's media supplemented with 2% fetal calf serum. B. The same experiment as A, except for culture condition. HeLa cells were cultured with Dulbecco's modified Eagle's media supplemented with 0.1% lactoalbumin hydrolysate.

伝子の転写が促進されて、高いCAT活性を示す。

Ki-rasのAP-1活性に対する影響を検討するために、pRSVras12/pX3cat, pRSVras12/pUcat, pRSVco/pX3cat, pRSVco/pUcat, という組み合わせでHeLa細胞にトランスフェクションしてCAT活性を測定した。

Fig. 8Aに示すように、pRSVras12/pUcat, pRSVco/pUcatではほぼ同レベルの微量なCAT活性を示した。それに比べるとpRSVras12/pX3cat, pRSVco/pX3catは、より高いCAT活性を示したが、両者の間に有意な差異はなく、rasの発現によるAP-1

(FOS/JUN)活性の上昇は見られなかった。

培養液中に存在する胎児血清の影響を除外するため、0.1%lactoalbumin hydrolysate加Dulbecco変法Eagle培養液を用いて、同様の実験を行ったが、rasの発現によりAP-1が活性化する所見は得られなかった(Fig. 8B)。

#### 4 考 察

pump-1は1988年Muller *et al*<sup>6)</sup>により、ヒトの悪性腫瘍の材料からrat transin(ヒトstromelysinのrat homologue)をprobeにしてクローニングされた。その後、pump-1 cDNAをCOS細胞で発現することにより、casein, proteoglycans, fibronectin, gelatin (type I, III, IV, V), laminin等を基質とするmatrix metalloproteinaseの一種であることが確認された<sup>24)</sup>。正常組織における発現については明らかではなく、ラットの分娩後の退縮期の子宮に一過性に発現することが報告されているのみである<sup>24)25)</sup>。

Matrix metalloproteinaseの分泌、活性化は、癌細胞が正常な組織構築のなかを浸潤していく上で、有利に作用する。本研究では、このような機序が消化管に由来する癌においても存在するかどうかを検討する目的で、10例の大腸癌の切除材料を用いて、pump-1遺伝子の発現をRT-PCR法によって検索した。

その結果、6例の癌組織で明らかにpump-1遺伝子の発現がみられ、残り4例においても微量のpump-1 mRNAの存在が示された。それに対して、同一症例の非癌部組織ではpump-1遺伝子の発現はほとんど検出されなかった。このことは、大腸粘膜の癌化に伴ってpump-1遺伝子の転写が促進することを示している。

また、微量なmRNAの存在を示すバンドが症例1, 5の非癌部組織に見られたが、PCRの増幅の結果であることを考慮すると、正常大腸粘膜におけるpump-1の発現は、認められるとしても極めて弱いことが示唆される。

このような癌組織におけるpump-1の発現は、消化器癌については報告がないが、他臓器の癌でも一部検討されており、頭頸部及び肺の扁平上皮癌<sup>26)</sup>、乳癌<sup>27)</sup>、前立腺癌等<sup>28)</sup>で報告がみられる。Pajouh *et al*<sup>28)</sup>は前立腺癌18例のうち14例で、pump-1 mRNAを検出したと述べている。さらに彼らは*in situ* hybridization法を用いて、pump-1 mRNAが間質の細胞や炎症細胞ではなく、癌細胞で発現していることを示している。

pump-1が癌部において正常組織よりも高い発現を示す機序については、これまでのところ明らかにされて

いない。Matrix metalloproteinase の 1 種である type IV collagenase は、Ha-*ras* 遺伝子の活性化による誘導<sup>29)30)</sup>が報告されている。Stromelysin, interstitial collagenase では、EGF などの増殖因子や IL-1 などのサイトカインによって、AP-1 を介して転写調節される可能性が示されている<sup>31)32)</sup>。このように matrix metalloproteinase の発現と癌遺伝子の関連が明らかにされつつある。

そこで、活性化 *ras* 遺伝子を発現ベクターに組み込んで細胞内に導入し、pump-1 遺伝子の発現に与える影響について検討した。3・3・2 に示したように、未処理の HeLa 細胞とコントロールベクターを導入した HeLa 細胞では、pump-1 の発現は検出されなかったが、pRSVras12 を導入した細胞では、pump-1 mRNA の存在を示す PCR 産物が確認された。このことは、pump-1 遺伝子の転写調節系に *ras* 遺伝子群が関与する可能性を示唆している。我々はさらに、Ki-*ras* による pump-1 の誘導が AP-1 (*FOS/JUN*) を介している可能性を考え、Ki-*ras* の発現による AP-1 活性化の有無を CAT assay により検討した。今回検討した限りでは、Ki-*ras* と AP-1 との関連を示す結果は得られなかったが、Ha-*ras* による AP-1 活性の上昇を示す報告<sup>33)</sup>が多数あるので、今後さらに詳細な検討が必要である。

大腸癌組織での pump-1 の発現が実際に *ras* の影響を受けているかどうかは現段階では不明である。大腸癌における Ki-*ras* 遺伝子の点突然変異の頻度は約 40%<sup>34)</sup>と報告されている。本研究における成績では、微量な mRNA の発現を含めるとほぼ全例で pump-1 遺伝子が発現しており、*ras* 遺伝子の点突然変異のみで pump-1 の発現を説明することは困難かもしれない。癌化と関連した他の機序、例えば癌抑制遺伝子や他の癌遺伝子等も考慮に入れる必要がある。

Pump-1 が大腸癌組織の中のどの細胞から産生されているのかについては、今回の検索では明らかではない。Quantin *et al*<sup>24)</sup> は pump-1 が間質の細胞で産生される可能性を指摘しているが、先にも述べたように Pajouh *et al*<sup>28)</sup> は *in situ* hybridization により、間質には pump-1 mRNA は見られず、癌細胞で発現されていたと報告している。本研究において活性化 *ras* 遺伝子の発現により pump-1 mRNA が誘導された成績から考えると、癌細胞が産生している可能性がうかがえる。他の細胞による産生の有無について、さらに検討する予定である。

Matrix metalloproteinase は細胞から分泌される際に proenzyme の形<sup>35)</sup>で分泌される。従って、プロテ

アーゼとして作用するためには、分泌後に活性化される必要がある。また matrix metalloproteinase と拮抗するインヒビターである TIMP-1, TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase) の存在が示されており<sup>36)37)</sup>、metalloproteinase の作用が転写レベルのみでなく分泌後にも様々な機序で調節されている可能性が強い。本研究において我々は、大腸癌組織から pump-1 mRNA を検出することにはじめて成功し、*ras* 遺伝子の活性化との関連性を推論したが、今後は蛋白レベルも含めて、pump-1 の *in vivo* における動態を検索することが重要と考えられた。これらの研究が、癌の浸潤・転移の機序をさらに明らかにすることが期待される。

## 5 要 約

培養細胞株及び大腸癌患者から得られた材料を用いて、pump-1 遺伝子の発現を RT-PCR 法により検索した。また活性化 Ki-*ras* 遺伝子を HeLa 細胞にトランスフェクトして、pump-1 遺伝子の発現の機序について検討した。その結果、以下の結論を得た。

1) 6 種類の大腸癌由来細胞株で検討したところ、BM 314 細胞株において pump-1 mRNA が検出された。

2) ヒトの大腸癌組織、及び非癌部組織における pump-1 遺伝子の発現を比較検討した。大腸癌 10 例のうち 6 例の癌組織で明らかな発現が確認された。残り 4 例も微量な pump-1 mRNA の存在を示した。それに対して、同一症例の非癌部組織ではほとんど発現を認めなかった。

3) 活性化 Ki-*ras* 遺伝子を導入された HeLa 細胞において、pump-1 mRNA の存在が検出された。このことから癌遺伝子の活性化と pump-1 の発現との関連が示唆された。また *ras* による pump-1 の誘導に、AP-1 が関与する可否かを、CAT assay により検討したが、明らかな関与を示す結果は得られなかった。

## 謝 辞

御指導、御校閲いただいた本学内科学第 1 講座 谷内昭教授並びに御指導、御協力いただいた同講座 今井浩三講師、日野田裕治博士、伊東文生先生はじめ諸先生に深謝いたします。

遺伝子を御供与くださった JCRB 遺伝子バンク、大腸癌の手術材料についてご協力をいただきました小樽協会病院内科遠藤高夫博士、伴紀宏博士、札幌外科記念病院山本直也院長に深謝致します。

本研究は文部省科学研究費補助金がん特別研究 I

(02151056 谷内) 及び重点領域研究 (02262231 今井), ならびに厚生省対癌 10 ケ年総合戦略(徳永班, 谷内) 及びがん研究助成金(大倉班, 今井) の補助によった。

## 文 献

1. Liotta, L. A.: Tumor invasion and metastasis-role of the extracellular matrix: Rhoads memorial award lecture. **Cancer Res.** **46**, 1-7 (1986)
2. Collier, I. E., Wilhelm, S. M., Eisen, A. Z., Marmer, B. L., Grant, G. A., Seltzer, J. L., Kronberger, A., He, C., Bauer, E. A. and Goldberg, G. I.: H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloproteinase capable of degrading basement membrane collagen. **J. Biol. Chem.** **263**, 6579-6587 (1988)
3. Wilhelm, S. M., Collier, I. E., Marmer, B. L., Eisen, A. Z., Grant, G. A. and Goldberg, G. I.: SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. **J. Biol. Chem.** **264**, 17213-17221 (1989)
4. Goldberg, G. I., Wilhelm, S. M., Kronberger, A., Bauer, E. A., Grant, G. A. and Eisen, A. Z.: Human fibroblast collagenase. **J. Biol. Chem.** **261**, 6600-6605 (1986)
5. Okada, Y., Nagase, H. and Harris, E. D., Jr.: A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective-tissue matrix components. **J. Biol. Chem.** **261**, 14245-14255 (1986)
6. Muller, D., Quantin, B., Gesnel, M. C., Millon-Collard, R., Abecassis, J. and Breathnach, R.: The collagenase gene family in humans consists of at least four members. **Biochem. J.** **253**, 187-192 (1988)
7. Goldberg, G. I. and Eisen, A. Z.: Extracellular matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Cancer Treat. Res.** **53**, 421-440 (1991)
8. Morikawa, K., Walker, S. M., Nakajima, M., Pathak, S., Jessup, J. M. and Fidler, I. J.: Influence of organ environment on the growth, selection, and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice. **Cancer Res.** **48**, 6863-6871 (1988)
9. Yamagata, S., Ito, Y., Tanaka, R. and Shimizu, S.: Gelatinases of metastatic cell lines of murine colonic carcinoma as detected by substrate-gel electrophoresis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **151**, 158-162 (1988)
10. Miyazaki, K., Hattori, Y., Umenishi, F., Yasumitsu, H. and Umeda, M.: Purification and characterization of extracellular matrix-degrading metalloproteinase, matrin (pump-1), secreted from human rectal carcinoma cell line. **Cancer Res.** **50**, 7758-7764 (1990)
11. Chomczynski, P. and Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.** **162**, 156-159 (1987)
12. Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. and Rutter, W. J.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. **Biochemistry** **18**, 5294-5299 (1979)
13. Haliassos, A., Chomel, J. C., Grandjouan, S., Kruh, J., Kaplan, J. C. and Kitzis, A.: Detection of minority point mutations by modified PCR technique: a new approach for a sensitive diagnosis of tumor-progression markers. **Nucleic Acids Res.** **17**, 8093-8099 (1989)
14. Nakajima-Iijima, S., Hamada, H., Reddy, P. and Kakunaga, T.: Molecular structure of the human cytoplasmic  $\beta$ -actin gene: Interspecies homology of sequences in the introns. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **82**, 6133-6137 (1985)
15. Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N.: Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science** **230**, 1350-1354 (1985)
16. McCoy, M. S., Bargmann, C. I. and Weinberg, R. A.: Human colon carcinoma Ki-ras2 oncogene and its corresponding proto-oncogene. **Mol. Cell. Biol.** **4**, 1577-1582 (1984)
17. Gorman, C. M., Merlino, G. T., Willingham, M. C., Pastan, I. and Howard, B. H.: The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **79**, 6777-6781 (1982)
18. Chen, C. and Okayama, H.: High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. **Mol. Cell. Biol.** **7**, 2745-2752 (1987)
19. Angel, P., Allegretto, E. A., Okino, S. T., Hattori, K., Boyle, W. J., Hunter, T. and Karin, M.: Oncogene *jun* encodes a sequence-specific *trans*-activator similar to AP-1. **Nature** **332**, 166-171



- (1988)
20. Lee, W., Mitchell, P. and Tjian, R.: Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. **Cell** **49**, 741-752 (1987)
  21. Haslinger, A. and Karin, M.: Upstream promoter element of the human metallothionein-II<sub>A</sub> gene can act like an enhancer element. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **82**, 8572-8576 (1985)
  22. Gorman, C. M., Moffat, L. F. and Howard, B. H.: Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. **Mol. Cell. Biol.** **2**, 1044-1051 (1982)
  23. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. P.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **74**, 5463-5467 (1977)
  24. Quantin, B., Murphy, G. and Breathnach, R.: Pump-1 cDNA codes for a protein with characteristics similar those of classical collagenase family members. **Biochemistry** **28**, 5327-5334 (1989)
  25. Woessner, J. F., Jr. and Taplin, C. J.: Purification and properties of a small latent matrix metalloproteinase of the rat uterus. **J. Biol. Chem.** **263**, 16918-16925 (1988)
  26. Muller, D., Breathnach, R., Engelmann, A., Millon, R., Bronner, G., Flesch, H., Dumont, P., Eber, M. and Abecassis, J.: Expression of collagenase-related metalloproteinase genes in human lung or head and neck tumours. **Int. J. Cancer** **48**, 550-556 (1991)
  27. Basset, P., Bellocq, J. P., Wolf, C., Stoll, I., Hutin, P., Limacher, J. M., Podhajcer, O. L., Chenard, M. P., Rio, M. C. and Chambon, P.: A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. **Nature** **348**, 699-704 (1990)
  28. Pajouh, M. S., Nagle, R. B., Breathnach, R., Finch, J. S., Brawer, M. K. and Bowden, G. T.: Expression of metalloproteinase genes in human prostate cancer. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** **117**, 144-150 (1991)
  29. Vousden, D. H., Eccles, S. A., Purvies, H. and Marshall, C. J.: Enhanced spontaneous metastasis of mouse carcinoma cells transfected with an activated c-Ha-ras-1 gene. **Int. J. Cancer** **37**, 425-433 (1986)
  30. Ura, H., Bonfil, R. D., Reich, R., Reddel, R., Pfeifer, A., Harris, C. C. and Klein-Szanto, A. J. P.: Expression of type IV collagenase and procollagenase genes and its correlation with the tumorigenic, invasive and metastatic abilities of oncogene-transformed human bronchial epithelial cells. **Cancer Res.** **49**, 4615-4621 (1989)
  31. Sirum-Connolly, K. and Brindkerhoff, C. E.: Interleukin-1 or phorbol induction of the stromelysin promoter requires an element that cooperates with AP-1. **Nucleic Acids Res.** **19**, 335-341 (1991)
  32. Lafyatis, R., Kim, S.-J., Angel, P., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Karin, M. and Wilder, R. L.: Interleukin-1 stimulates and *all-trans*-retinoic acid inhibits collagenase gene expression through its 5' activator protein-1-binding site. **Mol. Endocrinol.** **4**, 973-980 (1990)
  33. Sassone-Corsi, P., Der, C. J. and Verma, I. M.: *ras*-induced neuronal differentiation of PC12 cells: Possible involvement of *fos* and *jun*. **Mol. Cell. Biol.** **9**, 3174-3183 (1989)
  34. Bos, J. L., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Verlaan-de Vries, M., van Boom, J. H., van der Eb, A. J. and Vogelstein, B.: Prevalence of *ras* gene mutations in human colorectal cancers. **Nature** **327**, 293-297 (1987)
  35. He, C., Wilhelm, S. M., Pentland, A. P., Marmer, B. L., Grant, G. A., Eisen, A. Z. and Goldberg, G. I.: Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **86**, 2632-2636 (1989)
  36. Docherty, A. J. P. and Murphy, G.: The tissue metalloproteinase family and the inhibitor TIMP: a study using cDNAs and recombinant proteins. **Ann. Rheum. Dis.** **49**, 469-479 (1990)
  37. Howard, E. W., Bullen, E. C. and Banda, M. J.: Preferential inhibition of 72- and 92-kDa gelatinases by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. **J. Biol. Chem.** **266**, 13070-13075 (1991)

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第1講座 吉本 満